Литература

1. Подбор условий для выделения полевых изолятов возбудителей микоплазмозов птиц от больных птиц и из проб патологического материала / И.А, Рунина, М.И. Сорокина, М.Ю. Волков [и др.] // 2-й Междунар. вет. конгр. по птицеводству. М., 2006. С. 89-92.
2. Методические указания по приготовлению и поддержанию трахеальной органной культуры куриных эмбрионов и цыплят / О.А. Чупина [и др.] Владимир, 2004.
3. Bearson, S.M. Induction of a Mycoplasma gallisepticum pMGA gene in the chicken tracheal ring organ culture model / S.M. Bearson, S.D. Collier, B.L. Bearson // Avian Dis. 2003. Vol. 3. P. 745-749.
4. Cassell, G. H. Mycoplasmas respiratory infections / G.H. Cassell, W.A. Clyde, J.K. Davis // The Mycoplasmas. Mycoplasma Pathogenicity. Inc. Orlando, Acad. Press, 1985. Vol. 4. P. 69–106.
5. Feberwee, A. An experimental model to quantify horizontal transmission of Mycoplasma gallisepticum / A. Feberwee, D.R. Mekkes, D. Klinkenberg // Avian Pathol. 2005. Vol. 3. P. 355-361.
6. Papazisi, L. Analysis of cytadherence-deficient, GapA negative Mycoplasma gallisepticum strain R / L. Papazisi, K.E. Troy, T.S. Gorton // Infect. Immun. 2000. Vol. 68, №12. P. 6643-6649.

УДК 619:579.843.93:616-078

С.С. Сыбатуллов, О.В. Прунтова, О.И. Ручнова, С.А. Хрульнова
(ФГУП ГосНИИгенетика, г. Москва)

ПОЛУЧЕНИЕ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ *ORNITOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* В СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Введение

На протяжении последних 20 лет большое внимание зарубежные исследователи уделяют изучению бактерий *O. rhinotracheale*. В настоящее время считается доказанным, что *O. rhinotracheale* являются причиной острой контагиозной болезни, поражающей респираторные органы домашних птиц (аэросаккулит, ринотрахеит, пневмония, плеврит и др.). Смертность у цыплят-бройлеров при этой болезни может достигать 20%. У индеек в возрасте 12 недель и старше данная инфекция может вызывать острую пневмонию со смертностью, доходящей до 50% [1]. Степень выбраковки при убое пораженного стада цыплят–бройлеров может достигать 90%.

Длительность болезни, клиническая признаки, смертность при вспышках орнитобактериоза варьируют в зависимости от факторов окружающей среды: высокая плотность посадки птицы, повышенная концентрация аммиака в воздухе, недостаточная вентиляция, сопутствующие болезни [2, 3].

Бактерии *O. rhinotracheale* широко распространенны в странах с промышленно развитым птицеводством [2].

Изоляты *O. rhinotracheale* трудно дифферинцировать по биохимическим признакам от бактерий семейства *Pasteurellaceae*.

Для идентификации изолятов *O. rhinotracheale* широко применяют реакцию иммунодиффузии в агаровом геле, при помощи её было выделено 7 серотипов *O. rhinotracheale* (A, B, C, D, E, F, G), реакцию агглютинации, реакцию преципитации в агаровом геле и иммуноферментный анализ (ИФА) [4]. Для ИФА используют антигены *O. rhinotracheale*, инактивированные формальдегидом, экстрагированные кипячением и др. [3, 4].

В настоящее время в РФ отсутствует серологическая диагностика *O. rhinotracheale*.

Целью нашей работы было получение специфических компонентов *O. rhinotracheale* для использования в РА и ИФА, и оценка их активности и специфичности.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. В работе использовали бактерии *O. rhinotracheale* штамм К33 из музея ФГУ «ВНИИЗЖ», *Salmonella enteritidis* штамм №7, *Mycoplasma gallisepticum* штамм «S6», полученные из музея ФГУ «ВГНКИ»; *Pasteurella multocida* штамм №11039 серовариант А1,полученный из Американской коллекции типовых культур (АТСС).

Питательные среды. Биомассу бактерий получали путем культивирования на агаре, приготовленного на основе мясного перевара по Хоттингеру с добавлением 10% экстракта эритроцитов крови лошади и сердечно-мозговом бульоне (фирма Difco).

Получение антигенов для иммунизации кур. 24-часовую культуру бактерий, выросшую на агаре по Хоттингеру с кровяным экстрактом, смывали физиологическим раствором, содержащим 0,3% формалина, и отмывали 3 раза. Для иммунизации бройлерам использовали 15%-ную клеточную суспензию [5].

Получение О-антигена (О-АГ). Суспензию 24-часовой культуры бактерий осветляли центрифугированием при 3000 об\мин в течение 30 минут трижды. Полученный осадок бактерийных клеток заливали соляной кислотой и ставили в термостат на 12 часов при 37°С. После инкубации суспензию отмывали от соляной кислоты центрифугированием при 3000 об\мин в течение 30 минут трижды. Полученный осадок ресуспендировали фосфатно-буферным раствором (ФБР) с 0,3% раствором формалина.

Получение формалинизированного антигена (Ф-АГ). Суточную бактериальную суспензию культуры отмывали центрифугированием при 3000 обо\мин в течение 30 минут, полученный осадок растворяли в ФБР с 0,3% раствором формалина и инкубировали в термостате при 37° С в течение 24 часов. Проверяли полноту инактивации путём высева культуры, обработанной формалином, на агар на основе мясного перевара по Хоттингеру с экстрактом эритроцитов крови лошади. Инактивированную культуру трижды центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут. [3].

Получение К-антигена (К-АГ). Смывали 24-часовую культуру бактерий с агара 5мл ФБР. Суспензию ставили на водяную баню на 30 минут при 56°С. Далее осаждали бактерийные клетки центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут, а надосадок использовали в качестве капсульного антигена [4].

Получение прогретого цельно-клеточного антигена (100°-АГ). Смывали 24-часовую культуру бактерий с чашки Петри 5 мл ФБР. Суспензию бактериальных клеток прогревали на водяной бане 60 минут при 100°С. Полученную суспензию использовали для постановки иммунологических реакций [5].

Липополисахаридный антиген (ЛПС-АГ) был получен по методике фенол-водной экстракций [6].

Гипериммунную сыворотку (положительный контроль) получали по методике, описанной Hinz K.H. и Neumann U. (1991 год) [6].

Оценку активности и специфичности антигенов проводили при помощи реакции агглютинации (РА) и иммуноферментного анализа (ИФА). Реакцию агглютинации и непрямой вариант твердофазного ИФА для определения антител в сыворотках крови кроликов и свиней проводили по традиционным методикам [1]. Учет результатов ИФА проводили с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом при длине волны 492 нм. Оценку и интерпретацию результатов в ИФА проводили по S/P (отношению значений оптической плотности испытуемой сыворотки к значению оптической плотности положительного контроля):

$$\mathbf{S/P = gx - к^- / к^+ - к^-}, \text{ где}$$

gx – оптическая плотность испытуемой пробы сыворотки;

$к^-$ – оптическая плотность отрицательного контроля;

$к^+$ – оптическая плотность положительного контроля.

Если отношение S/P≤0,2, это означает, что проба отрицательная.

Если отношение S/P=0,21–0,29 – проба сомнительная.

Если отношение S/P≥0,3 – проба положительная.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки полученных данных использовали методы Бейли Н. [2].

Результаты исследований

Получение биомассы O. rhinotracheale. Бактерии *O. rhinotracheale* штамм К33 выращивали на стерильных чашках Петри с агаром на основе мясного перевара по Хоттингеру с добавлением экстракта эритроцитов крови лошади. Посев проводили сплошным газоном и дробно для контроля морфологии колоний. Культивировали в термостате при 37°С в течение 20-24 ч.

Колонии *O. rhinotracheale* имели правильную круглую форму, ровные края, серо-белый цвет, что является характерным для данного вида бактерий (рис. 1).

При электронном микроскопировании клетки *O. rhinotracheale* имели характерную морфологию: короткие палочки и коккобактерии (рис. 2).

Получение и оценка специфичности гипериммунных сывороток кур. Для иммунизации кур использовали формалинизиро-

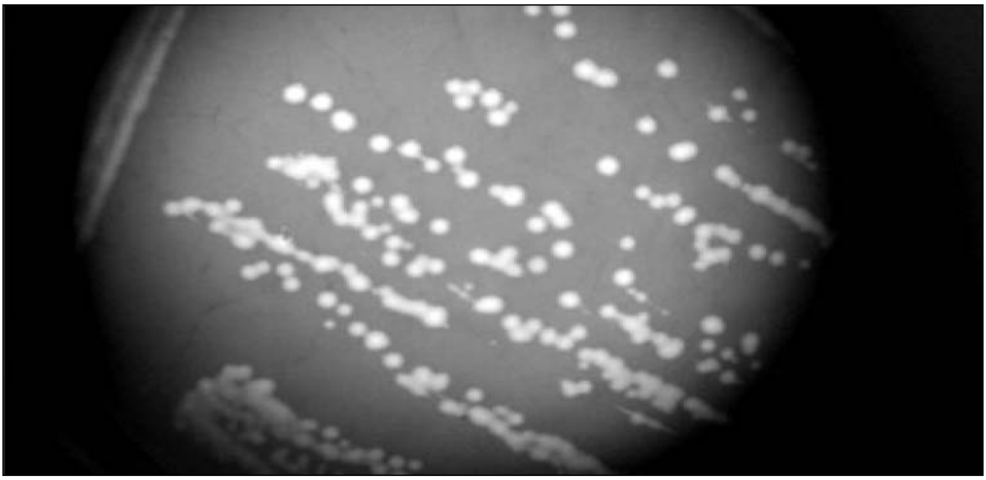


Рис. 1. Колонии *O. rhinotracheale* на агаре по Хоттингеру (увеличение х16 раз)

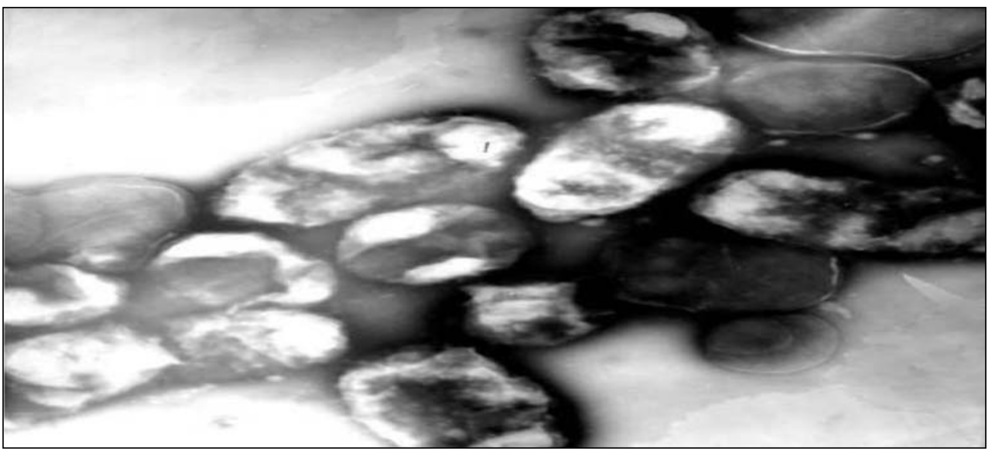


Рис. 2. Электронная микрофотография *O. rhinotracheale* (увеличение х25000 раз)

ванный антиген *O. rhinotracheale* с концентрацией микробных клеток 10 млрд./мл.

Кур иммунизировали по следующей схеме: первый этап иммунизации: внутримышечно 1 мл (0,5 мл формалинизированного антигена + 0,5 мл адъюванта), второй этап иммунизация: через 7 дней внутримышечно 0,5 мл антигена.

Через 10 дней проверяли сыворотку крови кур в РА. При титре 1:800, 1:1600 животных тотально обескровливали.

Таким образом, были получены семь вариантов проб сывороток крови кур, которые использовали в работе.

Определение активности и специфичности антигенов *O. rhinotracheale* в РА на стекле. На этом этапе работы сравнивали активность и специфичность О-АГ (наиболее часто использующегося в РА), ЛПС-АГ (который применяется в ИФА), а также формалинизированного (Ф-АГ) и прогретого (100°-АГ) антигенов в РА на стекле.

При анализе таблицы видно, что полученные антигены *O. rhinotracheale* в РА на стекле были активны и специфичны, так как положительный результат наблюдали только с гомологичной сывороткой.

Определение активности и специфичности антигенов *O. rhinotracheale* в количественной РА. Активность и специфичность формалинизированного и соматического антигенов проверяли также в реакции агглютинации на планшетах.

По результатам исследований, приведенных в таблице 2, видно, что сыворотка *O. rhinotracheale* реагировала только с гомологичными антигенами и не давала перекрестных реакций с гетерологичными, что обуславливает её специфичность.

Определение активности и специфичности антигенов *O. rhinotracheale* в ИФА. На этом этапе работы провели оценку активности и специфичности полученных антигенов *O. rhinotracheale* в ИФА.

Таблица 1

Оценка специфичности полученных антигенов в РА на стекле

АГ / Сыворотки	100°-АГ*	Ф-АГ**	О-АГ***	ЛПС-АГ****
O. rhinotracheale	++++	++++	++++	++++
S. enteritidis	+	-	-	-
P. multocida	-	-	-	-
M. gallisepticum	-	-	-	-

* – прогретый антиген;
** – формалинизированный антиген;
*** – соматический антиген;
**** – липополисахаридный антиген

Таблица 2

Оценка специфичности гипериммунной сыворотки кур в количественной РА

Антиген / Сыворотки	О-АГ* SE	О-АГ** PM	О-АГ*** MG	О-АГ**** ORT	Ф-АГ***** ORT
O.rhinotracheale	-	-	-	1600	>1600
S. enteritidis	1600	-	-	-	-
P.multocida	-	800	-	-	-
M.gallisepticum	-	-	1600	-	-

* – соматический антиген бактерий *S. enteritidis*.
** – соматический антиген бактерий *P. multocida*;
*** – соматический антиген бактерий *M. gallisepticum*;
**** – соматический антиген бактерий *O. rhinotracheale*;
***** – формалинизированный антиген бактерий *O. rhinotracheale*

Таблица 3

Оценка специфичности и активности Ф-АГ, К-АГ, 100є-АГ и ЛПС-АГ

АГ / проба	ЛПС-АГ		К-АГ		Ф-АГ		100°-АГ	
	Значение S/P – отношения/ оценка результатов							
S. enteritidis	0,095	N*	0,408±	P**	0,475	P	0,290	S
P. multocida	0,026	N	0,368	P	0,155	N	0,114	N
M. gallisepticum	0,323	P	0,338	P	0,062	N	0,121	N
1	0,229	S***	0,478	P	0,805	P	0,206	S
2	0,743	P	0,428	P	1,055	P	0,126	N
3	0,917	P	0,470	P	1,018	P	0,622	P
4	0,748	P	0,360	P	0,824	P	0,208	S
5	0,827	P	0,283	S	0,892	P	0,213	S
6	0,675	P	0,545	P	1,018	P	0,032	N
7	0,868	P	0,540	P	0,947	P	0,192	N

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – пробы сывороток крови кур, иммунизированных бактериями *O. rhinotracheale*;
* - N - отрицательная реакция;
** - P – положительная реакция;
*** - S – сомнительная реакция

При анализе таблицы 3, видно, что липополисахаридный антиген дает положительную реакцию с гомологичной сывороткой, кроме пробы №1 – S/P=0,229, а также с гетерологичной сывороткой к бактериям *M. gallisepticum* – S/P=0,338.

Капсульный антиген показал положительный результат со всеми гомологичными и гетерологичными исследуемыми сыворотками. Сомнительный результат дала проба №5 сыворотки крови кур с гомологичным капсульным антигеном (S/P=0,283)

Формалинизированный антиген показал специфичность и активность с гомологичными сыворотками, но с сывороткой S. enteriditis (S/P=0,475) показал положительный результат.

Прогретый антиген был не активным и не специфичным, как с гетерологичным сывороткам, так и с гомологичным, за исключением пробы №3 (S/P=0,622).

Из результатов исследований данного этапа работы, следует, что наиболее специфичными в ИФА являются липополисахаридный и формалинизированный антигены (S/P от 0,360 до 1,055). Не специфичным для иммуноферментного анализа показал себя прогретый антиген.

Для подтверждения этих результатов иммуноферментный анализ был поставлен в трех повторностях (таб. 4)

Оценка специфичности и активности ИФА и РА. В этом разделе мы проводили сравнительное исследование сывороток в РА и ИФА для выявления антител в сыворотке крови кур. Сравнение результатов проводили на примере ЛПС и формали-

Таблица 4

Оценка специфичности и активности липополисахаридного и формалинизированного антигенов

Антигены / Сыворотки	ЛПС-АГ*	Ф-АГ**
S. enteritidis	0.025±0.004	0.476±0.007
P. multocida	0.025±0.002	0.157±0.009
M. gallisepticum	0.321±0.002	0.068±0.006
1	0.286±0.05	0.810±0.05
2	0.745±0.004	1.058±0.008
3	0.918±0.03	1.024±0.06
4	0.747±0.006	0.826±0.009
5	0.827±0.007	0.895±0.006
6	0.679±0.004	1.021±0.004
7	0.879±0.014	0.954±0.006

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – пробы сывороток крови кур, иммунизированных бактериями *O. rhinotracheale*;
* – липополисахаридный антиген;
** – формалинизированный антиген

Таблица 5

Сравнительная оценка результатов ИФА и РА для ЛПС и формалинизированного антигена *O. rhinotracheale* штамма К33

Антигены / Сыворотки	ЛПС-АГ*		Ф-АГ**	
	в РА	в ИФА	в РА	в ИФА
S. enteritidis	S	N	S	P
P. multocida	N	N	N	N
M. gallisepticum	N	P	N	N
1	P	S	P	P
2	P	P	P	P
3	P	P	P	P
4	P	P	P	P
5	P	P	P	P
6	P	P	P	P
7	P	P	P	P

1-7 – пробы сывороток крови кур, иммунизированных бактериями *O. rhinotracheale*;
* – липополисахаридный антиген;
** – формалинизированный антиген

низированного антигена *O. rhinotracheale* штамма К33.

Данные сравнительного исследования сывороток крови кур в реакциях ИФА и РА, представленные в таблице 5, дали схожие результаты. Таким образом, полученные специфические сыворотки можно использовать в обеих реакциях, так как получены сопоставимые результаты.

Выводы

1. Соматический и формалинизированный антигены *O. rhinotracheale* в качественной и количественной РА были активными и специфичными.
2. В реакций ИФА активными и специфичными показали себя: липополисахаридный и формалинизированный антигены.
3. ЛПС-АГ и Ф-АГ можно использовать для выявления антител в сыворотке крови кур в РА и ИФА.
4. Полученные специфические сыворотки можно использовать в обеих реакциях.

РЕЗЮМЕ

Получены компоненты (антигены и сыворотки) Ornitobacterium rhinotracheale штамм К33 для использования в реакции агглютинации и иммуноферментном анализе.

SUMMARY

The paper presents results of induction and determination of activity and specificity of components of Ornitobacterium rhinotracheale strain K33 for ELISA.

Литература

1. Van Veen Linda; Do we know real impact of Ornithobacterium rhinotracheale infections? / L. van Veen // Poultry Inter., may2003 Vol.42., № 5. P. 20.
2. Hafez, M.H./ Diagnosis of Ornithobacterium rhinotracheale//. Int. J. of Poultry Sci. 2002. №1(5). P. 114-118.
3 Odor, E. M. / Isolation and Identification of Ornithobacterium rhinotracheale from Commercial Broiler Flocks on the Delmarva Penisuela. / E. M Odor., M. Salem., C.R. Pope. //Avian Dis.,vol. 41. 1997. P. 257-260.
4. Van Empel, P./ Identification and serotyping of Ornithobacterium rhinotraheale/ P. van Empel, H. van den Bosch, P. Loeffen// J. Clin. Microbiol., vol. 35, 1996. P. 418-421.
5 Van Empel, P. / Immunohistochemical and serological investigation of experimental Ornithobacterium rhinotraheale infection in chickens/ P. van Empel, M. Vrijenhoek, H. van den Bosch//Avian Pathol., 1999 vol. 28. P. 187-193.
6. Ryll, M / Pilotstudie zur Prдvalenz der Ornithobacterium rhinotracheale- Infection bei Masthьhn nordwestdeutschland/, M. Ryll., K.H. Hinz, U. Neumann // Tierдrztlich Wschr. 1997- Bd.110. S. 267-271